

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 9 月 29 日 (29.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
**WO 2005/090563 A1**

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, A01N 1/00, G01N 33/50

1-2-3 日清紡績株式会社 研究開発センター内  
Chiba (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/004773

(74) 代理人: 小島 隆司 (KOJIMA, Takashi); 〒1040061 東  
京都中央区銀座二丁目 1 6 番 1 2 号 銀座大塚ビル  
2 階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2005 年 3 月 17 日 (17.03.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,  
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2004-084702 2004 年 3 月 23 日 (23.03.2004) JP  
特願2004-217552 2004 年 7 月 26 日 (26.07.2004) JP

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護  
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,  
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,  
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,  
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日清紡  
績株式会社 (NISSHINBO INDUSTRIES, INC.) [JP/JP]; 〒  
1038650 東京都中央区日本橋人形町 2 丁目 3 1 番  
1 1 号 Tokyo (JP).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 大野 弘幸 (OHNO, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒  
1340092 東京都江戸川区一之江町 3 0 0 2 番地 ライ  
オンズガーデン一之江 3 1 4 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 深谷 幸信  
(FUKAYA, Yukinobu) [JP/JP]; 〒1870011 東京都小平  
市鈴木町 1-2 4 5-6 Tokyo (JP). 増田 現 (MASUDA,  
Gen) [JP/JP]; 〒2670056 千葉県千葉市緑区大野台

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SOLVENT FOR DISSOLVING NUCLEIC ACID, NUCLEIC ACID-CONTAINING SOLUTION AND METHOD OF  
PRESERVING NUCLEIC ACID

(54) 発明の名称: 核酸溶解用溶媒、核酸含有溶液および核酸保存方法

(57) Abstract: As a solvent for dissolving a nucleic acid such as DNA or RNA, a solvent comprising an ionic liquid having, for  
example, ammonium cation, imidazolium cation or pyridinium cation is used and the nucleic acid is dissolved therein and preserved.  
Thus, a nucleic acid such as DNA or RNA can be easily dissolved and preserved over a long period of time.

(57) 要約: DNA, RNA 等の核酸を溶解させる核酸溶解用溶媒として、例えば、アンモニウムカチオン、イミ  
ダゾリウムカチオン、ピリジニウムカチオン等を有するイオン性液体からなるものを用い、この溶媒に核酸を溶解  
させて保存する。これにより、DNA および RNA 等の核酸を容易に溶解できるとともに、それらの長期保存が可  
能となる。



WO 2005/090563 A1

## 明 細 書

### 核酸溶解用溶媒、核酸含有溶液および核酸保存方法

#### 技術分野

- [0001] 本発明は、核酸溶解用溶媒、核酸含有溶液および核酸保存方法に関し、さらに詳述すると、イオン性液体からなるDNA、RNA等の核酸溶解用溶媒、およびこの溶媒を用いた核酸含有溶液、核酸保存方法に関する。

#### 背景技術

- [0002] DNAおよびRNAは、遺伝を司る遺伝情報物質である。そのゲノム情報を解読し、遺伝子配列を組み換える等のバイオテクノロジー技術を用い、遺伝子レベルでの生物種の機能改善が多方面で試みられている。

また、これらDNAおよびRNAの用途は、上記バイオテクノロジー分野に留まらず、DNAやRNAの遺伝情報を活用した遺伝子診断、遺伝子治療、疾病原因の解明等の医療分野における新規診断・治療法としての応用も急速に進展している。

- [0003] 一方で、核酸は、生物であれば必ず持っている生体高分子であり、天然に大量に存在することや、生分解性があることなど、材料として特筆すべき点が多い。しかも、DNAやRNAは、化学的な手法により、さらなる高機能化が可能な材料でもある。このため、DNAおよびRNAを工業的な材料として利用するための研究が進展している。

- [0004] ところで、DNAは、プリンまたはピリミジンの誘導体である含窒素複素環式塩基、すなわち、核酸塩基を1分子、デオキシリボースを1分子、リン酸を1分子含むデオキシリボヌクレオチドモノマー単位からなる鎖状の高分子である。一方、RNAも、核酸塩基を1分子、リボースを1分子、リン酸を1分子含むリボヌクレオチドモノマー単位の共有結合鎖からなる。

このように、DNAおよびRNAは、親水性のリン酸および糖を主骨格として有する高分子化合物であるため、極めて親水性が高い物質である。

- [0005] DNAおよびRNAの取り扱い、これらが極めて高い親水性を有することから、従来、水を溶媒とする系でのみ取り扱われていた。

水は、核酸を溶解するのに好適な溶媒ではあるものの、使用可能な温度範囲は0〜100℃程度と狭く、また水中では取り扱うことができない試薬などを用いた反応を起こすことができないなど、核酸を工業的に応用する際の条件が限られてしまうという問題があった。このため、使用可能な温度範囲が広く、水中では進行し難い、または水中では不可能な反応を行うことのできる溶媒が求められている。

[0006] また、DNA、RNAは、それぞれDNA分解酵素、RNA分解酵素により水中では容易に加水分解を受けることが知られており、DNAおよびRNAの保存に際しては、DNA分解酵素やRNA分解酵素を除去した水中に溶存させる必要がある。

しかし、水は蒸発し易い溶媒であるため、保存容器に工夫が必要となる。しかも、生体から直接抽出した核酸試料中にDNA、RNAの分解酵素が含まれている場合や、生物の唾液中に存在している、または皮膚に付着している核酸分解酵素が外部から系内に混入した場合は、系内に存在または混入した酵素の活性によりDNAまたはRNAが容易に分解されることから、水を溶媒として長期的にDNA、RNAを保存することは不可能であった。

[0007] DNAおよびRNA分解酵素を失活させる試薬を利用してDNAおよびRNAの長期保存を可能とする方法も知られているが、使用する試薬によっては、細胞毒性や癌原性を有するものもあり、さらには、核酸塩基を化学修飾する可能性もあるため、簡便な保存法とまではなっていない。

一方、核酸を含む試料を凍結乾燥することにより、水の非存在下において、核酸を保存することも可能であるが、この方法は、凍結乾燥機のある場所でなければ実施することができず、また乾燥後、0℃以下で保存しなければならないことから、簡便な保存法とはなり得ない。

[0008] DNAおよびRNA分解酵素は、高濃度の無機塩を含む水溶液中では高次構造が壊れ、変性することが報告されている(非特許文献1:P.J. von Hippel, J. Biol. Chem., 10, 3913(1965))。

この技術を応用し、DNAおよびRNAを高塩濃度の水溶液に溶解させることが簡便な長期保存法となり得ると考えられる。

しかし、溶媒として水を使用することによりは変わらないため、その蒸発を防止する工夫

が必要であるのみならず、保存後に、DNAおよびRNAを脱塩するための複雑な操作が必要となることから、長期保存法として適当なものであるとはいえない。

このように、DNAおよびRNAを簡便に長期間保存し得る手法の確立が求められている。

[0009] 非特許文献1:P.J. von Hippel, J. Biol. Chem., 10, 3913 (1965)

#### 発明の開示

#### 発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、このような事情に鑑みてなされたものであり、DNAおよびRNA等の核酸を容易に溶解できるとともに、それらの長期保存が可能な核酸溶解用溶媒、およびこの溶媒を用いた核酸含有溶液、核酸保存方法を提供することを目的とする。

#### 課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、上記目的を達成するため鋭意検討を重ねた結果、室温で液状の塩、すなわちイオン性液体が、DNA, RNAを容易に溶解し得ることを見出すとともに、DNA, RNAをイオン性液体中に溶解させた状態で長期保存が可能となることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、

1. 核酸を溶解することのできるイオン性液体からなることを特徴とする核酸溶解用溶媒、
2. 前記イオン性液体を構成するカチオンが、アンモニウムカチオン、イミダゾリウムカチオンおよびピリジニウムカチオンから選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする1の核酸溶解用溶媒、
3. 前記イオン性液体を構成するアニオンが、ハロゲン化物イオンまたは総炭素数1〜3のカルボン酸イオンであることを特徴とする1または2の核酸溶解用溶媒、
4. 前記イオン性液体が、中和型イオン性液体であることを特徴とする1の核酸溶解用溶媒、
5. 核酸保存用または核酸反応用であることを特徴とする1〜4のいずれかの核酸溶解用溶媒、
6. 核酸をイオン性液体に溶解させてなることを特徴とする核酸含有溶液、

7. 核酸をイオン性液体中に溶解させた状態で保存することを特徴とする核酸保存方法  
を提供する。

### 発明の効果

[0012] 本発明の核酸溶解用溶媒は、核酸可溶のイオン性液体からなるものであるため、DNA, RNAを容易に溶解し得るだけでなく、DNA, RNAをイオン性液体中に溶解させた状態で長期間保存することができる。

すなわち、イオン性液体は、高イオン密度であり、また水と同様に極性が高い液体であるため、多数の親水性基を有するDNA, RNA等を溶解することができる。

また、イオン性液体は、極めて高いイオン強度を有しており、この液体中では核酸分解酵素が失活するためか、DNA, RNAをイオン性液体中に溶解させることで、長期間安定的な保存が可能となる。しかも、イオン性液体は、蒸気圧が極めて低いか、全く無いため、高温・減圧下でも蒸発しない。このため、保存に際して容器等に工夫をこらさなくとも、長期に亘りイオン性液体の基本性能を維持することができ、この点からしても長期保存に最適である。

さらに、イオン性液体は、広い温度域で液状を示す物質であるため、核酸の反応溶媒としてイオン性液体を使用した場合、従来の水と異なり、広い温度域での反応が可能となるだけでなく、水中で取り扱いが不可能な試薬を用いた反応を行うことも可能となるものである。

### 図面の簡単な説明

[0013] [図1]実施例9, 10の可視紫外吸収スペクトルを示す図である。

[図2]実施例11, 12の可視紫外吸収スペクトルを示す図である。

[図3]実施例13の可視紫外吸収スペクトルを示す図である。

[図4]実施例13のCDスペクトルを示す図である。

[図5]実施例14の可視紫外吸収スペクトルを示す図である。

[図6]実施例14のCDスペクトルを示す図である。

[図7]合成例8で得られたイオン性液体EMIIm-HCOOのNMRチャートを示す図である。

## 発明を実施するための最良の形態

[0014] 以下、本発明についてさらに詳しく説明する。

本発明に係る核酸溶解用溶媒は、イオン性液体からなるものである。

イオン性液体としては、核酸を溶解することのできる(核酸可溶な)ものであれば、特に限定されるものではない。また、本発明においては、中和型のイオン性液体も用いることが可能である。

ここで、中和型のイオン性液体とは、酸-塩基の中和反応により得られる塩からなるイオン性液体(イオン性液体-開発の最前線と未来-、19-21頁、(株)シーエムシー出版(2003)参照)であり、プロトンが付加してなるカチオンを有することを特徴とする。

[0015] 上記イオン性液体の中では核酸の溶解性に優れているという点から、それを構成するカチオンが、アンモニウムカチオン、イミダゾリウムカチオンおよびピリジニウムカチオンから選ばれる少なくとも1種であることが好ましい。中でも核酸の溶解性に著しく優れ、高濃度の核酸含有溶液を調製できることから、特にイミダゾリウムカチオンであることが好ましい。

なお、本発明において、「核酸を溶解することのできる(核酸可溶な)」とは、溶媒中に核酸を10質量%以下、好ましくは5.0質量%以下程度の量で添加してなる白濁液を、加熱する等により核酸を溶解させて均一透明溶液とした後、室温(20℃程度)まで冷却しても析出してこない性状をいう。

[0016] イミダゾリウムカチオンとしては、特に限定はなく、例えば、モノアルキルイミダゾリウムカチオン、ジアルキルイミダゾリウムカチオン、トリアルキルイミダゾリウムカチオン等が挙げられ、具体例としては、1-エチル-3-メチルイミダゾリウムイオン、1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムイオン、1-プロピル-3-メチルイミダゾリウムイオン、1-(1,2または3-ヒドロキシプロピル)-3-メチルイミダゾリウムイオン、1,2,3-トリメチルイミダゾリウムイオン、1,2-ジメチル-3-エチルイミダゾリウムイオン、1,2-ジメチル-3-プロピルイミダゾリウムイオン、1-ブチル-2,3-ジメチルイミダゾリウムイオン、イミダゾリウムイオン、1-メチルイミダゾリウムイオン、1-エチルイミダゾリウムイオン、1,2-ジメチルイミダゾリウムイオンなどが挙げられる。

ピリジニウムカチオンとしては、特に限定されるものではなく、例えば、N-プロピルピリジニウムイオン、N-ブチルピリジニウムイオン、1-ブチル-4-メチルピリジニウムイオン、1-ブチル-2, 4-ジメチルピリジニウムイオン、2-メチルピリジニウムイオン、3-メチルピリジニウムイオン、4-メチルピリジニウムイオンなどが挙げられる。

[0017] アンモニウムカチオンとしては、特に限定されるものではないが、脂肪族または脂環式のアンモニウムイオンをカチオン成分とするものであることが好ましい。

これらの脂肪族および脂環式のアンモニウムイオンとしても、特に限定されるものではなく、例えば、ジエチルアンモニウムイオン、トリエチルアンモニウムイオン、メキシエチルアンモニウムイオン、ジエチル(2-メキシエチル)アンモニウムイオン、トリメチルプロピルアンモニウムイオン、トリメチルヘキシルアンモニウムイオン、テトラペンチルアンモニウムイオン、ジエチルメチル(2-メキシエチル)アンモニウムイオン等の種々の1-4級アルキルアンモニウムイオン、N-メチルピロリジニウムイオン、N-ブチル-N-メチルピロリジニウムイオンなどが挙げられる。

[0018] また、イオン性液体を構成するアニオンとしては、例えば、 $\text{BF}_4^-$ 、 $\text{PF}_6^-$ 、 $\text{AsF}_6^-$ 、 $\text{SbF}_6^-$ 、 $\text{AlCl}_4^-$ 、 $\text{HSO}_4^-$ 、 $\text{ClO}_4^-$ 、 $\text{CH}_3\text{SO}_3^-$ 、 $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$ 、 $\text{CF}_3\text{CO}_2^-$ 、 $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{CO}_2^-$ 、 $\text{CH}_3\text{CO}_2^-$ 、 $\text{HCO}_2^-$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Br}^-$ 、 $\text{I}^-$ 等の各種アニオンを用いることができるが、核酸の溶解性を高めるという点からハロゲン化物イオンまたは総炭素数1-3のカルボン酸イオンが好ましく、中でも $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Br}^-$ 、 $\text{HCO}_2^-$ であることが好ましい。

[0019] イオン性液体は、加熱真空脱水されたものであることが好ましく、その含水量としては、1.0質量%以下、好ましくは0.5質量%以下程度であることが好ましい。なお、脱水時の加熱温度、減圧度等はイオン性液体の種類に応じて適宜選定すればよい。また、含水量は、カールフィッシャー水分計による測定値である。

[0020] 本発明に係る核酸含有溶液は、上述したイオン性液体からなる核酸溶解用溶媒に核酸を溶解させてなるものである。

この場合、イオン性液体中における核酸含有量としては、使用するイオン性液体の種類によって溶解度の変動するものであるため、一概には規定できないが、通常10質量%以下、好ましくは1.0-5.0質量%程度である。

[0021] イオン性液体中に、核酸を溶解させる手法としては、特に限定されるものではない

が、イオン性液体中に所定量の核酸を添加した後、70～120℃程度に加熱して核酸を溶解させる方法を用いることができる。この場合、核酸がイオン性液体中に溶解したか否かは、核酸を添加した時点では白濁状の溶液が、加熱後に均一透明になることから判断できる。

本発明の核酸溶解用溶媒を用いた核酸含有溶液は、これを一旦加熱して、核酸を溶解させて均一透明状態とした後、再び10～25℃程度に冷却しても、核酸が析出して白濁を呈することはない。

[0022] 以上で説明した核酸溶解用溶媒および核酸含有溶液は、DNA、RNA等の核酸を溶存させる必要がある全ての用途に適用可能である。

具体例としては、核酸溶解用溶媒を核酸の保存に用い、核酸含有溶液とした状態で保存することで、核酸分解酵素が失活する環境下で核酸を保存することができ、極めて簡便に核酸の長期安定保存が可能となる。この場合、保存温度としては特に限定されるものではないが、一般的な環境温度である0～40℃程度での保存が可能であり、特殊な環境下でなく室温にて長期間保存することができる。

また、核酸溶解用溶媒を核酸の反応に用い、この溶媒中でDNA、RNAの化学修飾反応等を行うことで、従来溶媒である水中では取り扱うことのできなかった試薬を用いた反応や、水中では進行し難い反応を、0～100℃の温度範囲の制限を受けることなく行うことができる。

## 実施例

[0023] 以下、合成例および実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明するが、本発明は、下記の実施例に限定されるものではない。なお、下記実施例におけるイオン性液体の構造確認は、<sup>1</sup>H-NMR (Alpha-500、日本電子(株)製)を用いて行った。また、合成例6～8において、生成物中にハロゲン化物が混入していないことは0.1M硝酸銀水溶液(関東化学(株)製)を添加した際にハロゲン化銀の生成に伴う溶液の白濁が起こらないことにより確認した。さらに、イオン性液体中にDNAおよびRNAが溶解したことは、白濁状態から均一透明溶液になることで判断した。

[0024] [合成例1]

N-メチルイミダゾール(アルドリッチ社製)10gと3-クロロ-1-プロパノール(東京化



成工業(株)製) 12gとを混合し、窒素雰囲気下、60℃で還流しながら7日間攪拌した後、反応生成物をジエチルエーテル(関東化学(株)製) 300ml中に滴下し、沈殿した液体を回収した。沈殿物をメタノール(和光純薬工業(株)製) 10mlに溶解させた溶液を、ジエチルエーテル300ml中に滴下し、沈殿した液体を回収した。得られた液体をエタノール(和光純薬工業(株)製) 300mlに溶解し、活性炭素粉末(和光純薬工業(株)製) 20gを添加し、24時間攪拌した。その後、活性炭素粉末を濾別し、溶媒を減圧下にて留去することにより、イオン性液体 $\text{HO}(\text{CH}_2)_3\text{MIN}-\text{Cl}$ を得た。

[0025] [合成例2]

N-メチルイミダゾール5gと3-ブロモ-1-プロパノール(アルドリッチ社製) 8.5gとを混合し、窒素雰囲気下、60℃で還流しながら3日間攪拌した後、反応生成物をジエチルエーテル250ml中に滴下し、沈殿した液体を回収した。沈殿物をメタノール10mlに溶解させた溶液を、ジエチルエーテル300ml中に滴下し、沈殿した液体を回収した。得られた液体をメタノール300mlに溶解し、活性炭素粉末20gを添加し、24時間攪拌した。その後、活性炭素粉末を濾別し、溶媒を減圧下にて留去することにより、イオン性液体 $\text{HO}(\text{CH}_2)_3\text{MIN}-\text{Br}$ を得た。

[0026] [合成例3]

N-メチルイミダゾール10gと1-クロロプロパン(東京化成工業(株)製) 50gとを混合し、窒素雰囲気下、45℃で還流しながら7日間攪拌した後、未反応の1-クロロプロパンを留去し、反応生成物をジエチルエーテル300ml中に滴下し、沈殿した液体を回収した。沈殿物をメタノール10mlに溶解させた溶液を、ジエチルエーテル300ml中に滴下し、沈殿した液体を回収した。得られた液体をアセトニトリル(和光純薬工業(株)製) 300mlに溶解し、活性炭素粉末20gを添加し、24時間攪拌した。その後、活性炭素粉末を濾別し、溶媒を減圧下にて留去することにより、イオン性液体 $\text{PMIN}-\text{Cl}$ を得た。

[0027] [合成例4]

N-メチルイミダゾール10gと1-ブロモプロパン(関東化学(株)製) 50gとを混合し、窒素雰囲気下、50℃で還流しながら4日間攪拌した後、反応生成物をジエチルエーテル300ml中に滴下し、沈殿した液体を回収した。沈殿物をメタノール10mlに溶解

させた溶液を、ジエチルエーテル300ml中に滴下し、沈殿した液体を回収した。得られた液体をアセトニトリル300mlに溶解し、活性炭素粉末20gを添加し、24時間攪拌した。その後、活性炭素粉末を濾別し、溶媒を減圧下にて留去することにより、イオン性液体PMIN-Brを得た。

[0028] [合成例5]

N-メチルイミダゾール(アルドリッチ社製)10gとブロモエタン(関東化学(株)製)20mlとを混合し、窒素雰囲気下、0℃で2日間反応させた後、反応生成物をジエチルエーテル(関東化学(株)製)300ml中に滴下し、沈殿した白色固体を回収した。沈殿物にジエチルエーテル300mlを添加して2時間攪拌した後、沈殿した白色固体を回収した。残存する溶媒を減圧下にて留去することにより、EMIm-Brを得た。

[0029] [合成例6]

合成例5で得たEMIm-Br2gを脱イオン水60mlに溶解した溶液を、陰イオン交換樹脂アンバーライト IRA-400 (OH) (Sperco社製)150mlを充填したカラムに通し、EMIm-OHの水溶液を得た。

[0030] [合成例7]

合成例6で得たEMIm-OH水溶液60mlと、プロピオン酸(関東化学(株)製)0.8gとを混合し、24時間氷浴中で攪拌した後、水を減圧下にて留去し、反応生成物を得た。反応生成物をジエチルエーテル(関東化学(株)製)300ml中に滴下し、沈殿した液体を回収した。沈殿物をメタノール(和光純薬工業(株)製)5mlに溶解させた溶液を、ジエチルエーテル300ml中に滴下し、沈殿した液体を回収した。減圧下、回収した沈殿物から残存溶媒を留去してイオン性液体EMIm-C<sub>2</sub>COOを得た。

[0031] [合成例8]

合成例6で得たEMIm-OH水溶液60mlと、ギ酸(和光純薬工業(株)製)0.5gとを混合し、24時間氷浴中で攪拌した後、水を減圧下にて留去し、反応生成物を得た。反応生成物をジエチルエーテル(関東化学(株)製)300ml中に滴下し、沈殿した液体を回収した。沈殿物をメタノール(和光純薬工業(株)製)5mlに溶解させた溶液を、ジエチルエーテル300ml中に滴下し、沈殿した液体を回収した。減圧下、回収した沈殿物から残存溶媒を留去してイオン性液体EMIm-HCOOを得た。

## [0032] [合成例9]

N-メチルイミダゾール(ACROS ORGANICS製)5g(61mmol)と塩酸(和光純薬工業(株)製)を蒸留水にて2mol/lに希釈した塩酸水溶液30.5mlを混合し、24時間氷浴中で攪拌した。その後、凍結乾燥および減圧することで水を留去し、イオン性液体MIm-Clを得た。

## [0033] [合成例10]

N-メチルイミダゾール(ACROS ORGANICS製)5g(61mmol)とギ酸(和光純薬工業(株)製)2.3ml(61mmol)を混合し、24時間氷浴中で攪拌した。その後、水を減圧下で留去し、イオン性液体MIm-HCOOを得た。

## [0034] [実施例1]

合成例1で作製したイオン性液体 $\text{HO}(\text{CH}_2)_3\text{MIN-Cl}$  1gを110℃で24時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でDNA(大和化成(株)製)10mgと混合し、密封した後、加熱しながらDNAの溶解温度を記録した。その結果、DNA10mgがイオン性液体 $\text{HO}(\text{CH}_2)_3\text{MIN-Cl}$  1gに完全に溶解する温度は70℃であった。

## [0035] [実施例2]

合成例1で作製したイオン性液体 $\text{HO}(\text{CH}_2)_3\text{MIN-Cl}$  1gを110℃で24時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でRNA(東京化成工業(株)製)10mgと混合し、密封した後、加熱しながらRNAの溶解温度を記録した。その結果、RNA10mgがイオン性液体 $\text{HO}(\text{CH}_2)_3\text{MIN-Cl}$  1gに完全に溶解する温度は60℃であった。

## [0036] [実施例3]

合成例2で作製したイオン性液体 $\text{HO}(\text{CH}_2)_3\text{MIN-Br}$  1gを110℃で24時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でDNA10mgと混合し、密封した後、加熱しながらDNAの溶解温度を記録した。その結果、DNA10mgがイオン性液体 $\text{HO}(\text{CH}_2)_3\text{MIN-Br}$  1gに完全に溶解する温度は87℃であった。

## [0037] [実施例4]

合成例2で作製したイオン性液体 $\text{HO}(\text{CH}_2)_3\text{MIN-Br}$  1gを110℃で24時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でRNA10mgと混合し、密封した後、加熱しながらRNAの溶解温度を記録した。その結果、RNA10mgがイオン性液体 $\text{HO}(\text{CH}_2)_3\text{MIN-}$

Br 1gに完全に溶解する温度は82℃であった。

[0038] [実施例5]

合成例3で作製したイオン性液体PMIN-Cl 1gを110℃で24時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でDNA10mgと混合し、密封した後、加熱しながらDNAの溶解温度を記録した。その結果、DNA10mgがイオン性液体PMIN-Cl 1gに完全に溶解する温度は80℃であった。

[0039] [実施例6]

合成例3で作製したイオン性液体PMIN-Cl 1gを110℃で24時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でRNA10mgと混合し、密封した後、加熱しながらRNAの溶解温度を記録した。その結果、RNA10mgがイオン性液体PMIN-Cl 1gに完全に溶解する温度は70℃であった。

[0040] [実施例7]

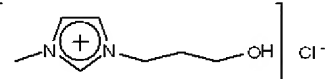
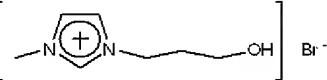
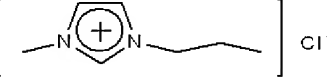
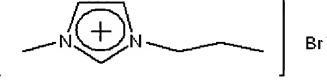
合成例4で作製したイオン性液体PMIN-Br 1gを110℃で24時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でDNA10mgと混合し、密封した後、加熱しながらDNAの溶解温度を記録した。その結果、DNA10mgがイオン性液体PMIN-Br 1gに完全に溶解する温度は90℃であった。

[0041] [実施例8]

合成例4で作製したイオン性液体PMIN-Br 1gを110℃で24時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でRNA10mgと混合し、密封した後、加熱しながらDNAの溶解温度を記録した。その結果、RNA10mgがイオン性液体PMIN-Br 1gに完全に溶解する温度は82℃であった。

[0042] 上記各実施例1～8において使用したイオン性液体の構造、DNAおよびRNAの各イオン性液体に対する溶解温度を表1に示す。

[0043] [表1]

	イオン性液体		核酸溶解温度 (°C)
	名称	構造式	
実施例1	OH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> MIN-Cl		70
実施例2			60
実施例3	OH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> MIN-Br		87
実施例4			82
実施例5	PMIM-Cl		80
実施例6			70
実施例7	PMIM-Br		90
実施例8			82

## [0044] [実施例9, 10]

合成例1で作製したイオン性液体HO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>MIN-Cl 2.5gを110℃で24時間加熱真空乾燥した。このイオン性液体2.5gと、DNA1mg(実施例9)、1.5mg(実施例10)とを混合し、それぞれ84℃で加熱溶解し、さらに常温で48時間放置した。

得られた各DNA含有溶液を、光路長1mm角型石英セルに入れ、室温で可視紫外吸収スペクトルを測定した(UV-2500PC、(株)島津製作所製)。得られたスペクトルを図1に示す。

[0045] 図1に示されるように、得られた可視紫外吸収スペクトルは、核酸塩基に由来する260nm付近の吸収がDNAの添加量に応じて変化し、また吸収を持たない320nm以上の波長域での吸光度がゼロであったことから、イオン性液体中にDNAが常温においても溶存していることがわかる。

## [0046] [実施例11, 12]

合成例1で作製したイオン性液体HO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>MIN-Cl 2.5gを110℃で24時間加熱真空乾燥した。このイオン性液体2.5gと、RNA1mg(実施例11)、1.5mg(実施例12)とを混合し、それぞれ74℃で加熱溶解し、さらに常温で48時間放置した。得られた各RNA含有溶液について、実施例9と同様にして可視紫外吸収スペクトルを測定した。得られたスペクトルを図2に示す。

図2に示されるように、得られた可視紫外吸収スペクトルは、核酸塩基に由来する260nm付近の吸収がRNAの添加量に応じて変化し、また吸収を持たない320nm以

上の波長域での吸光度がゼロであったことから、イオン性液体中にRNAが常温においても溶存していることがわかる。

[0047] [実施例13]

実施例1で調製したDNA含有溶液を120時間保存した後、これに2-プロパノール(東京化成工業(株)製)3mlを混合した。この混合溶液を室温下、遠心分離器(KA-1000、(株)久保田製作所製)により3000rpmで15分間遠心分離を行った後、上澄み溶液を除去した。沈殿物にエタノール3mlを加え、さらに3000rpmで15分間遠心分離を行った後、上澄み溶液を除去した。

沈殿物を0.2mlの蒸留水に溶解し、塩化ナトリウム(和光純薬工業(株)製)10mgを添加した後、エタノール2mlを添加した。得られた溶液を、3000rpmで15分間遠心分離を行い、上澄み溶液を除去した。沈殿物に、85質量%エタノール水溶液2mlを混合し、3000rpmで15分間の遠心分離を行った。上澄み溶液を除去し、沈殿物に、再び85質量%エタノール水溶液2mlを混合して3000rpmで15分間の遠心分離を行った後、上澄み溶液を除去し、最終的に得られた沈殿物を常温で真空乾燥した。

[0048] 乾燥して得られた白色粉末状のDNA2mgを蒸留水5mlに溶解し、実施例9と同様にして可視紫外吸収スペクトルを測定した。得られたスペクトルを図3に示す。

図3に示されるように、核酸塩基に由来する260nmの吸収があり、対照DNAと同様の吸収スペクトルが得られたことから、保存後に単離した白色粉末はDNAであることが確認された。

[0049] さらに白色粉末状のDNA2mgを蒸留水5mlに溶解した溶液を光路長1mmの角形石英セルにし、室温下、CDスペクトルを測定した(J-720、日本分光(株)製)。得られたスペクトルを図4に示す。

図4に示されるように、対照DNAと同様のスペクトルが得られたことから、保存後に単離した白色粉末は、天然DNAと同様に右巻き2重らせん構造を保持していることが確認された。

[0050] [実施例14]

実施例2で得られたRNA含有溶液を用いた以外は、実施例13と同様にして白色

粉末状のRNAを単離した。

この白色粉末RNAについて、実施例13と同様にして可視紫外吸収スペクトルおよびCDスペクトルを測定した。得られたスペクトルをそれぞれ図5, 6に示す。

図5に示されるように、核酸塩基に由来する260nmの吸収があり、対照RNAと同様の吸収スペクトルが得られたことから、保存後に単離した白色粉末はRNAであることが確認された。図6に示されるように、対照RNAと同様のスペクトルが得られたことから、保存後に単離した白色粉末は、天然RNAと同様に右巻き2重らせん構造を保持していることが確認された。

[0051] [実施例15]

合成例7で作製したイオン性液体EMI<sub>m</sub>-C<sub>2</sub>COO 1gを、90℃で36時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でDNA(大和化成(株)製)5mgと混合し、密封した後、加熱しながらDNAの溶解温度を記録した。その結果、DNA5mgがイオン性液体EMI<sub>m</sub>-C<sub>2</sub>COO 1gに完全に溶解する温度は70℃であった。

[0052] [実施例16]

合成例7で作製したイオン性液体EMI<sub>m</sub>-C<sub>2</sub>COO 1gを、90℃で36時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でRNA(東京化成工業(株)製)5mgと混合し、密封した後、加熱しながらRNAの溶解温度を記録した。その結果、RNA5mgがイオン性液体EMI<sub>m</sub>-C<sub>2</sub>COO 1gに完全に溶解する温度は60℃であった。

[0053] [実施例17]

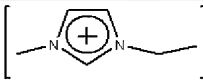
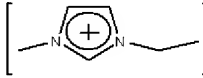
合成例8で作製したイオン性液体EMI<sub>m</sub>-HCOO 1gを、90℃で36時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でDNA5mgと混合し、密封した後、加熱しながらDNAの溶解温度を記録した。その結果、DNA5mgがイオン性液体EMI<sub>m</sub>-HCOO 1gに完全に溶解する温度は60℃であった。

[0054] [実施例18]

合成例8で作製したイオン性液体EMI<sub>m</sub>-HCOO 1gを、90℃で36時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でRNA5mgと混合し、密封した後、加熱しながらRNAの溶解温度を記録した。その結果、RNA5mgがイオン性液体EMI<sub>m</sub>-HCOO 1gに完全に溶解する温度は48℃であった。

上記実施例15～18において使用したイオン性液体の構造、DNAおよびRNAの各イオン性液体に対する溶解温度を表2に示す。

[0055] [表2]

	イオン性液体		核酸溶解温度 (°C)
	名称	構造式	
実施例15	EMIm-C <sub>2</sub> COO		70
実施例16			60
実施例17	EMIm-HCOO		60
実施例18			48

[0056] [実施例19]

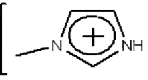
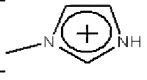

合成例9で作製したイオン性液体MIm-Cl 1gを70°Cで16時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でDNA((株)ニチロ製) 10mgと混合し、密封した後、加熱しながらDNAの溶解温度を記録した。その結果、DNA10mgがイオン性液体MIm-Cl 1gに完全に溶解する温度は76°Cであった。

[0057] [実施例20]

合成例10で作製したイオン性液体MIm-HCOO 1gを70°Cで16時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でDNA((株)ニチロ製) 10mgと混合し、密封した後、加熱しながらDNAの溶解温度を記録した。その結果、DNA10mgがイオン性液体MIm-HCOO 1gに完全に溶解する温度は85°Cであった。

[0058] 上記各実施例19および20において使用したイオン性液体の構造、DNAの各イオン性液体に対する溶解温度を表3に示す。

[0059] [表3]

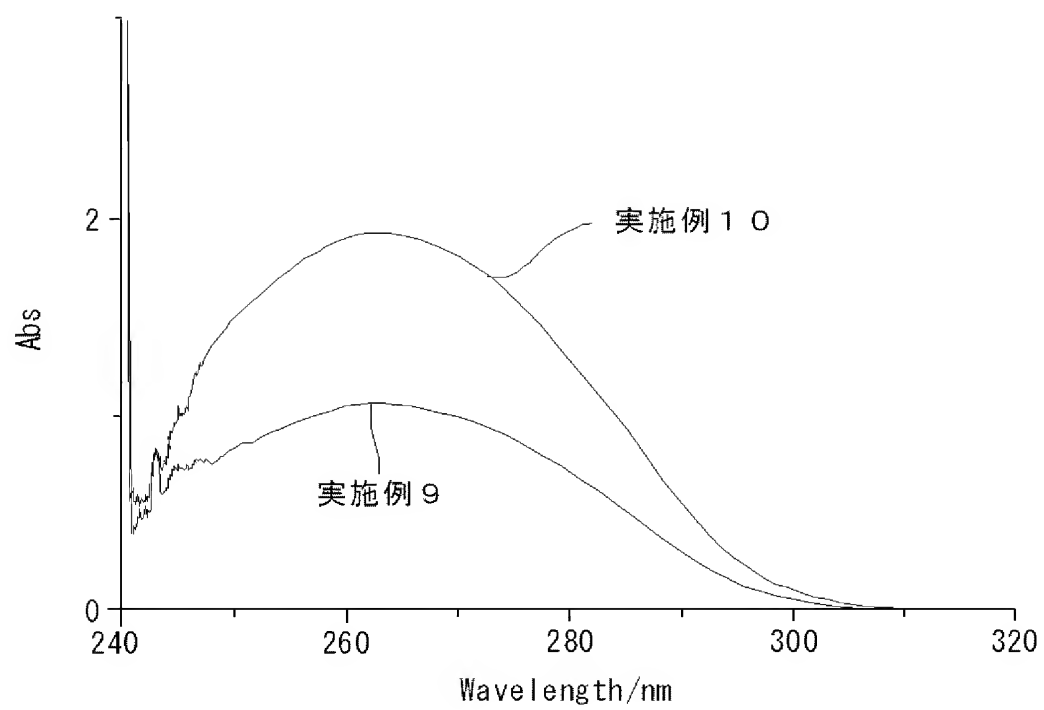
	イオン性液体		核酸溶解温度 (°C)
	名称	構造式	
実施例19	MIm-Cl	 Cl <sup>-</sup>	76
実施例20	MIm-HCOO	 	85



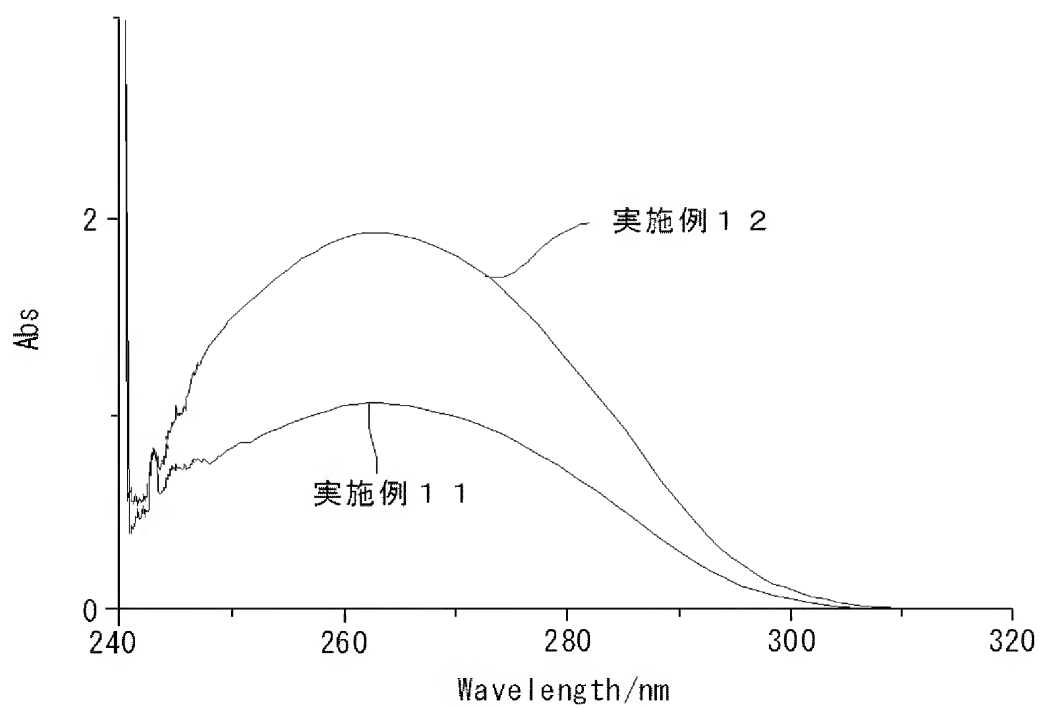
### 請求の範囲

- [1] 核酸を溶解することのできるイオン性液体からなることを特徴とする核酸溶解用溶媒。
- [2] 前記イオン性液体を構成するカチオンが、アンモニウムカチオン、イミダゾリウムカチオンおよびピリジニウムカチオンから選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする請求項1記載の核酸溶解用溶媒。
- [3] 前記イオン性液体を構成するアニオンが、ハロゲン化物イオンまたは総炭素数1〜3のカルボン酸イオンであることを特徴とする請求項1または2記載の核酸溶解用溶媒。
- [4] 前記イオン性液体が、中和型イオン性液体であることを特徴とする請求項1記載の核酸溶解用溶媒。
- [5] 核酸保存用または核酸反応用であることを特徴とする請求項1〜4のいずれか1項に記載の核酸溶解用溶媒。
- [6] 核酸をイオン性液体に溶解させてなることを特徴とする核酸含有溶液。
- [7] 核酸をイオン性液体中に溶解させた状態で保存することを特徴とする核酸保存方法。

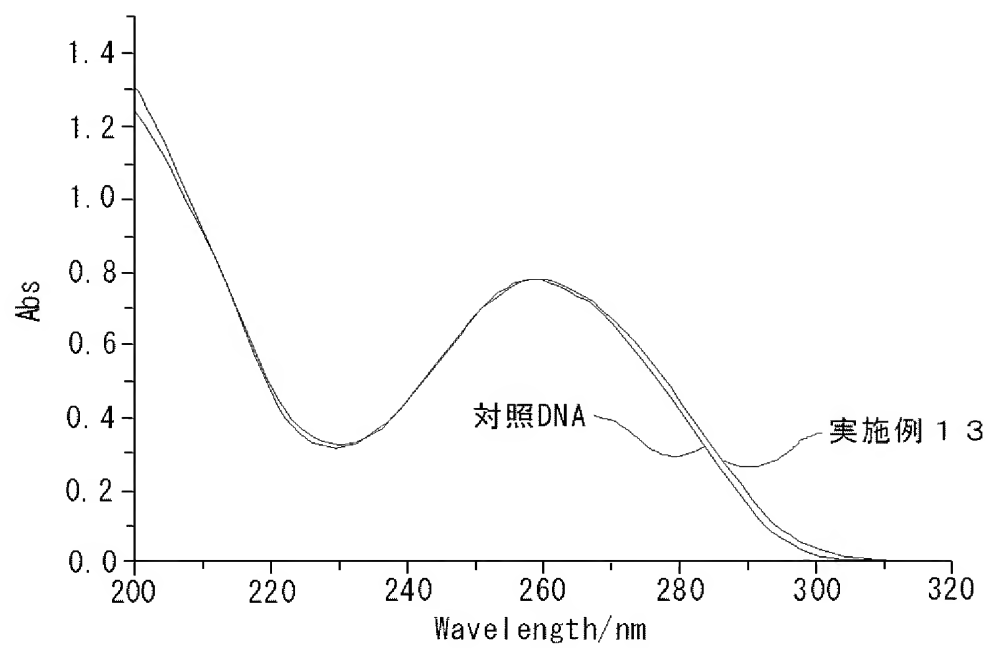
[図1]



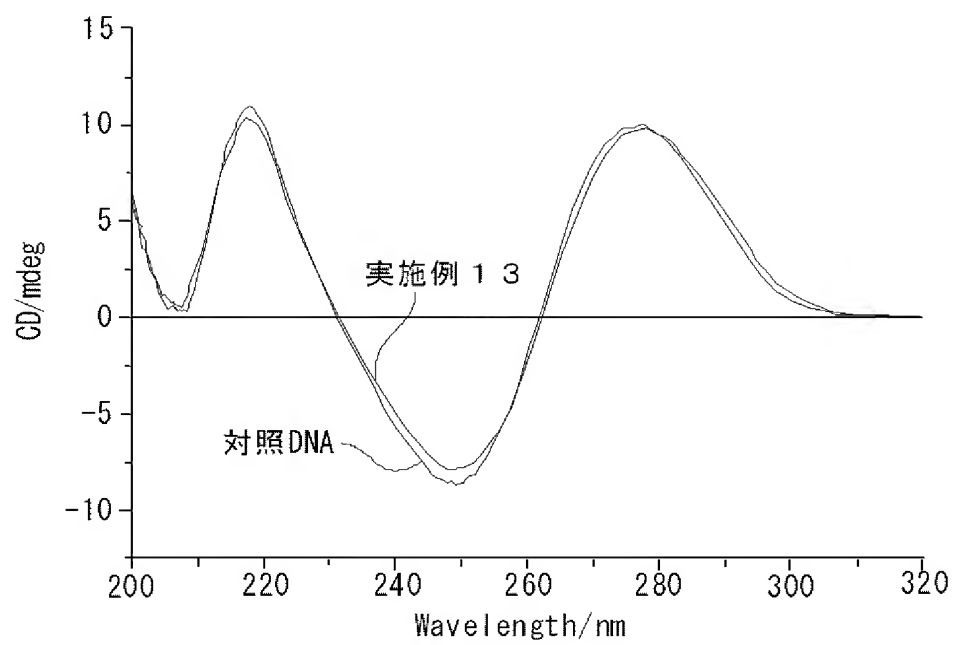
[図2]



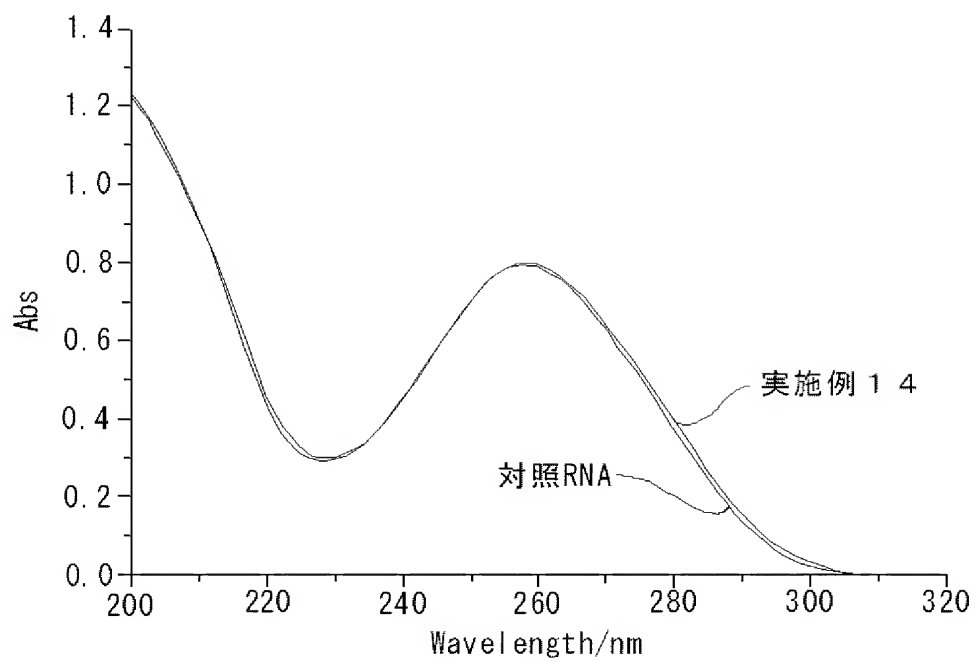
[図3]



[図4]

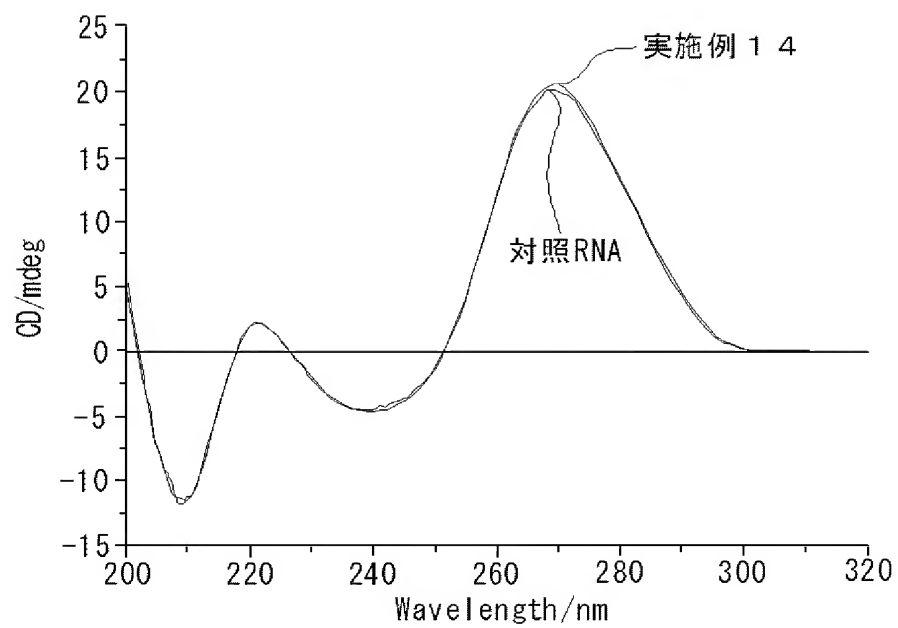


[図5]

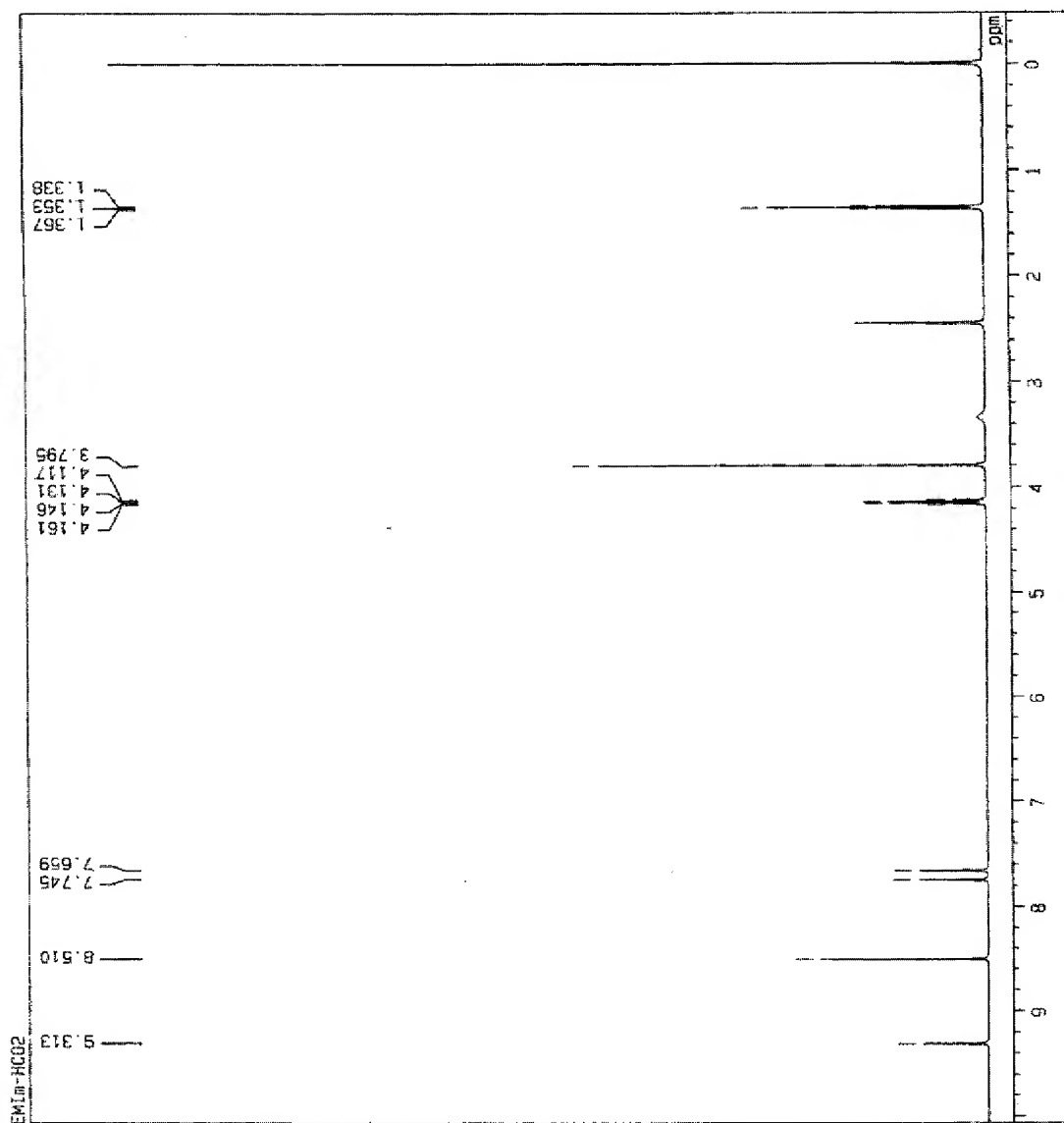


6/7

[圖6]



[図7]





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004773

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/09, A01N1/00, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/09, A01N1/00, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Yukinobu FUKAYA et al., "Kakusan o Yokai saseru Noryoku o Motsu Ion Ekitai no Sakusei", CSJ: The Chemical Society of Japan Dai 84 Shunki Nenkai - Koen Yokoshu I, 11 March, 2004 (11.03.04), page 353 (2D4-05)	1-7
Y	JP 2002-3478 A (Japan Science and Technology Corp.), 09 January, 2002 (09.01.02), Claims 2 to 5; Par. No. [0011] (Family: none)	1-7
Y	OHNO et al., Ion Conductive Characteristics of DNA Film Containing Ionic Liquids, Journal of The Electrochemical Society, Vol.148, No.4, 2001.04, E168-170	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 April, 2005 (13.04.05)

Date of mailing of the international search report

10 May, 2005 (10.05.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004773

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Hiroyuki ONO, "DNA o Mochiite Ion Dendo Zairyo o Tsukuru", Chemical Education, Vol.52, No.3, 20 March, 2004 (20.03.04), pages 174 to 177	1-7
Y	Naomi NISHIMURA et al., "DNA no Ion-sei Ekitai, Ion-sei Ekitai - Kaihatsu no Saizensen to Mirai -", 01 February, 2003 (01.02.03), pages 202 to 207	1-7
A	NISHIMURA et al., Ion conductive characteristics of DNA containing PEO chains covalently bound on nucleic acid bases, Polym.Adv.Technol., Vol.15, No.6, 2004.06, pages 335 to 339	1-7
A	Naomi NISHIMURA et al., "Alkyl-ka shita Enki o Yusuru DNA no Ion-sei Ekitai", Polymer preprints, Japan, Vol.51, No.12, 18 September, 2002 (18.09.02), page 3163	1-7

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004773

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: parts of 1 to 7  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
See extra sheet.
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1 to 7 present a solution for dissolving a nucleic acid which comprises ammonium cation, a solution for dissolving a nucleic acid which comprises imidazolium cation, a solution for dissolving a nucleic acid which comprises pyridinium cation, a solution for dissolving a nucleic acid which comprises halide cation, a solution for dissolving a nucleic acid which comprises a carboxylate ion having from 1 to 3 carbon atoms in total, and a solution for dissolving a nucleic acid which comprises a neutralized ionic liquid. The matter common to these inventions resides in a solvent for dissolving a nucleic acid which comprises an ionic liquid.  
(continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004773

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

Claims 1 and 4 to 7

The meaning of "an ionic liquid" as set forth in claims 1 and 4 to 7 is unknown. Thus, claims 1 and 4 to 7 are not described clearly and briefly.

Concerning an ionic liquid as set forth in claims 1 and 4 to 7, it is not stated in practice that nucleic acids can be dissolved in ionic liquids other than those described in Examples, etc. Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is unknown whether or not nucleic acids can be dissolved in any ionic liquids. Thus, the inventions according to claims 1 and 4 to 7 are neither supported by the description nor described therein in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search was made on the inventions claims of which are not clearly and briefly stated and the inventions which are neither fully supported by the description nor sufficiently clearly and completely disclosed therein.

Claim 2

Concerning ammonium cation and pyridinium cation constituting the ionic liquid as set forth in claim 2, it is not stated in practice in Examples, etc. that nucleic acids can be dissolved therein. Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is unknown whether or not these cations contribute to the dissolution of nucleic acids. Thus, the invention according to claim 2 is neither supported by the description nor described therein in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search was made on the invention which is neither fully supported by the description nor sufficiently clearly and completely disclosed therein.

Claim 3

Concerning a solution for dissolving a nucleic acid as set forth in claim 1 which comprises a halide ion or a carboxylate ion having from 1 to 3 carbon atoms in total as an anion constituting the ionic liquid as set forth in claim 3, it is not stated in practice in Examples, etc. that nucleic acids can be dissolved in an ionic liquid comprising such an anion alone. Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is unknown whether or not an ionic liquid comprising such an anion alone contributes to the dissolution of nucleic acids. Thus, the invention according to claim 3 is neither supported by the description nor described therein in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search was made on the invention which is neither fully supported by the description nor sufficiently clearly and completely disclosed therein.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004773

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

However, imidazolium cation and a halide ion constituting an ionic liquid in which nucleic acids can be dissolved and a neutralized ionic liquid comprising such a cation and such an anion are reported in document 1 (Yukinobu FUKAYA et al., Kakusan o Yokai saseru Noryoku o Motsu Ion-sei Ekitai no Sakusei, CSJ: The Chemical Society of Japan Dai 84 Shunki Nenkai - Koen Yokoshu I, 11 March, 2004 (11.03.04), page 353, 2 D4-05 (see Fig. 1). Therefore, the above common matter cannot be regarded as "a special technical feature" in the meaning within PCT Rule 13.2.

Such being the case, claims 1 to 7 have six groups of inventions, i.e., the inventions wherein the cation constituting an ionic liquid is ammonium cation, the inventions wherein the cation constituting an ionic liquid is imidazolium cation, the inventions wherein the cation constituting an ionic liquid is pyridinium cation, the inventions wherein the anion constituting an ionic liquid is a halide ion, the inventions wherein the anion constituting an ionic liquid is a carboxylate ion having from 1 to 3 carbon atoms in total, and the inventions relating to a neutralized ionic liquid.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/09, A01N1/00, G01N33/50

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/09, A01N1/00, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JICST ファイル(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	深谷幸信, 他, 核酸を溶解させる能力を持つイオン液体の作成, 日本化学会第 84 春季年会一講演予稿集 I, 2004. 03. 11, p. 353(2 D4-05)	1-7
Y	JP 2002-3478 A (科学技術振興事業団) 2002. 01. 09, 【請求項 2】 - 【請求項 5】, 段落番号 【0011】 (ファミリーなし)	1-7
Y	OHNO, et al., Ion Conductive Characteristics of DNA Film Containing Ionic Liquids, Journal of The Electrochemical	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 04. 2005

国際調査報告の発送日

10. 5. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

阪野 誠司

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

3538

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	Society, Vol.148, No. 4, 2001.04, E168-170	
Y	大野弘幸, DNA を用いてイオン伝導材料を創る, 化学と教育, Vol. 52, No. 3, 2004. 03. 20, p. 174-177	1 - 7
Y	西村直美, 他, DNA のイオン性液体化, イオン性液体—開発の最前 線と未来—, 2003. 02. 01, p. 202-207	1 - 7
A	NISHIMURA, et al., Ion conductive characteristics of DNA containing PEO chains covalently bound on nucleic acid bases, Polym. Adv. Technol., Vol.15, No.6, 2004.06, p. 335-339	1 - 7
A	西村直美, 他, アルキル化した塩基を有するDNAのイオン性液体 化, 高分子学会予稿集, Vol. 51, No. 12, 2002.09.18, p. 3163	1 - 7

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、
2. ☒ 請求の範囲 1-7の一部 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
特別ページを参照。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 1-7 には、アンモニウムカチオンからなる核酸溶解用溶液、イミダゾリウムカチオンからなる核酸溶解用溶液、ピリジニウムカチオンからなる核酸溶解用溶液、ハロゲン化合物イオンからなる核酸溶解用溶液、総炭素数 1~3 のカルボン酸からなるイオン核酸溶解用溶液、及び、中和型イオン性液体からなる核酸溶解用溶液が記載されている。これらの発明に共通する事項は、核酸溶解用溶媒がイオン性液体からなることである。  
(特別ページに続く)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



### 請求の範囲 1、4-7

請求の範囲 1、4-7 の「イオン性液体」は、どのようなものか不明である。よって、請求の範囲 1、4-7 は明確かつ簡潔に記載されていない。

請求の範囲 1、4-7 のイオン性液体について、実施例等で示された以外のイオン性液体が、核酸を溶解できることが実際に示されておらず、出願時の技術常識を参酌してもあらゆるイオン性液体が核酸溶解作用を有することは不明である。したがって、請求の範囲 1、4-7 に係る発明について、明細書に裏付けられているとは言えないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に記載されていない。

なお、請求の範囲が明確かつ簡潔に記載されていない発明、及び、明細書に十分に裏付けられておらず明細書に明確かつ十分に開示されていない発明については、調査を行っていない。

### 請求の範囲 2

請求の範囲 2 のイオン性液体を構成するアンモニウムカチオン、及び、ピリジニウムカチオンについて、実施例等を見ても、核酸を溶解できることが実際に示されておらず、出願時の技術常識を参酌しても該カチオンが核酸溶解作用を有することは不明である。したがって、請求の範囲 2 に係る発明について、明細書に裏付けられているとは言えないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に記載されていない。

なお、明細書に十分に裏付けられておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない発明については、調査を行っていない。

### 請求の範囲 3

請求の範囲 3 の、イオン性液体を構成するアニオンがハロゲン化物イオンまたは総炭素数 1～3 のカルボン酸イオンであることを特徴とする請求項 1 記載の核酸溶解用溶液について、実施例等を見ても、該アニオンのみから成るイオン性液体が核酸を溶解できることが実際に示されておらず、出願時の技術常識を参酌しても該アニオンのみから成るイオン性液体が核酸溶解作用を有することは不明である。したがって、請求の範囲 3 に係る発明について、明細書に裏付けられているとは言えないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に記載されていない。

なお、明細書に十分に裏付けられておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない発明については、調査を行っていない。

### 第Ⅲ欄の続き

しかしながら、文献 1（深谷幸信，他，核酸を溶解させる能力を持つイオン性液体の作成，日本化学会第 84 春季年会－講演予稿集 I，2004.03.11，p.353，2 D4-05）には、核酸を溶解できるイオン性液体の構成物質であるイミダゾリウムカチオン、ハロゲン化物イオン、及び、該カチオンと該アニオンから構成される中和型イオン性液体が記載されており（図 1 参照）、上記共通事項は PCT 規則 13.2 における「特別な技術的特徴」であるとはいえない。

したがって、請求の範囲 1-7 には、イオン性液体を構成するカチオンがアンモニウムカチオンである発明、イオン性液体を構成するカチオンがイミダゾリウムカチオンである発明、イオン性液体を構成するカチオンがピリジニウムカチオンである発明、イオン性液体を構成するアニオンがハロゲン化物イオンである発明、イオン性液体を構成するアニオンが総炭素数 1～3 のカルボン酸イオンである発明、及び、中和型イオン性液体の発明、の 6 発明が含まれている。